

④ 17

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-140092

(43)Date of publication of application : 25.05.1999

(51)Int.Cl.

C07G 17/00
A23B 4/00
A23L 1/22
// A23B 7/10
A23L 1/202
A23L 1/221
A23L 1/31
A23L 1/317
A23L 1/325
A23L 1/328
A23L 1/48

(21)Application number : 10-234622

(71)Applicant : KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 20.08.1998

(72)Inventor : FUNAHASHI TAKASHI
SAITOU TAKAHIRO
KATSUMI IKUO

(30)Priority

Priority number : 09240862 Priority date : 05.09.1997 Priority country : JP

(54) HIGHLY ACTIVE NUCLEIC ACID TASTINESS INGREDIENT PRESERVATIVE AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject ingredient with high 5'-ribonucleotidase inhibitory activity and improved color tone, usable as an agent inhibiting the degradation of inosinic acid through addition to foods having 5'-ribonucleotidase activity such as various pickles, miso (fermented soybean paste), and karashimentaike (salted cod roe with red pepper) and preserving their tastiness.

SOLUTION: This pale-colored, highly active nucleic acid tastiness ingredient preservative or pale-colored, high-purity polyphenols are obtained by subjecting a plant containing such ingredient preservative or polyphenols like tea leaves to preliminary extraction with water and/or inorganic acid-contg. water followed by subjecting the remaining plant to further extraction with water, ethanol, acetone, aqueous ethanol solution and/or aqueous acetone solution.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-140092

(43) 公開日 平成11年(1999) 5月25日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 0 7 G 17/00		C 0 7 G 17/00 Z
A 2 3 B 4/00		A 2 3 L 1/22 C
A 2 3 L 1/22		A 2 3 B 7/10 A
// A 2 3 B 7/10		A 2 3 L 1/202 1 0 3
A 2 3 L 1/202	1 0 3	1/221 C
審査請求 未請求 請求項の数59 O L (全 15 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願平10-234622	(71) 出願人	000000941 鐘淵化学工業株式会社 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
(22) 出願日	平成10年(1998) 8月20日	(72) 発明者	舟橋 孝 兵庫県神戸市東灘区西岡本3丁目15-13
(31) 優先権主張番号	特願平9-240862	(72) 発明者	斎藤 隆宏 兵庫県明石市魚住町清水2068-1-303
(32) 優先日	平9(1997) 9月5日	(72) 発明者	勝見 郁男 兵庫県神戸市西区宮下3丁目5-8
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 高活性核酸旨味成分保持剤およびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 核酸旨味成分保持剤またはポリフェノール類を含む植物体より単に熱水、エタノール水溶液で抽出しただけでは、それら活性、純度が低く、色合いもよくない。従来は、更に樹脂処理、溶媒分画を行う等により精製しているが、これよりも低コスト、且つ簡便な製造法を必要としている。

【解決手段】 茶葉等、核酸旨味成分保持剤またはポリフェノール類を含む植物体を無機酸を含む水、および／または水で予備抽出した後、残りの植物体より、水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、アセトン水溶液で抽出することにより淡色高活性な核酸旨味成分保持剤または淡色高純度のポリフェノール類が得られる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸旨味成分保持剤を含む植物体を、無機酸を含む水、および／または水で予備抽出した残りの植物体より、水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出して得られる高活性核酸旨味成分保持剤。

【請求項2】 無機酸を含む水および／または水を植物体の重量に対して3～50倍量用いて予備抽出してなる請求項1記載の高活性核酸旨味成分保持剤。

【請求項3】 予備抽出した残りの植物体の重量に対して、5～30倍量の溶媒を用いて抽出してなる請求項1記載の高活性核酸旨味成分保持剤。

【請求項4】 無機酸で予備抽出したのち、無機酸を水洗除去して20～60体積%のエタノール水溶液またはアセトン水溶液で抽出してなる請求項1記載の高活性核酸旨味成分保持剤。

【請求項5】 無機酸を含む水の無機酸濃度が0.1～1重量%である請求項1または請求項4記載の高活性核酸旨味成分保持剤。

【請求項6】 0～80℃の水で予備抽出してなる請求項1記載の高活性核酸旨味成分保持剤。

【請求項7】 予備抽出した残りの植物体より、無機酸、有機酸、および還元剤から選択される少なくとも1種を含む溶媒により抽出してなる請求項6記載の高活性核酸旨味成分保持剤。

【請求項8】 無機酸が、塩酸、磷酸、亜硫酸、硫酸、および硝酸から選択される少なくとも1種である請求項1、請求項4、請求項5、または請求項7記載の高活性核酸旨味成分保持剤。

【請求項9】 有機酸が、酢酸、クエン酸、コハク酸、乳酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、これら有機酸のナトリウム塩およびカリウム塩から選択される少なくとも1種である請求項7記載の高活性核酸旨味成分保持剤。

【請求項10】 還元剤が、アスコルビン酸、エリスロニン酸、およびそれらの塩から選択される少なくとも1種である請求項7記載の高活性核酸旨味成分保持剤。

【請求項11】 植物体が、茶葉、ピーナッツ内皮、玉葱の皮、エビスグサ、ギシギシ、ソバ殻、ゲンノショウコ、ブドウの皮、ヒシの実、シナモン、ビンロウジュ、貫衆から選択される少なくとも1種である請求項1記載の高活性核酸旨味成分保持剤。

【請求項12】 植物体が緑茶、ウーロン茶、および紅茶から選択される少なくとも1種の茶葉である請求項11記載の高活性核酸旨味成分保持剤。

【請求項13】 核酸旨味成分保持剤を含む植物体を水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出し、更にケイ酸マグネシウム、ケイ酸カルシウム、およびケイ酸アルミニウムから選択される少なくとも1

種のケイ酸塩で処理して得られる高活性核酸旨味成分保持剤。

【請求項14】 核酸旨味成分保持剤を含む植物体を、無機酸を含む水、および／または水で予備抽出した残りの植物体より、水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出し、更にケイ酸マグネシウム、ケイ酸カルシウム、およびケイ酸アルミニウムから選択される少なくとも1種のケイ酸塩で処理して得られる高活性核酸旨味成分保持剤。

【請求項15】 抽出液にケイ酸塩を加えたものを攪拌したのち濾過してなる請求項13または請求項14記載の記載の高活性核酸旨味成分保持剤。

【請求項16】 抽出液を、ケイ酸塩を濾過装置の濾材の上に敷いたところへ流し込んで濾過してなる請求項13または請求項14記載の高活性核酸旨味成分保持剤。

【請求項17】 ポリフェノール類を含む植物体を、無機酸を含む水、および／または水で予備抽出した残りの植物体より、水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出して得られるポリフェノール類。

【請求項18】 無機酸を含む水および／または水を植物体の重量に対して3～50倍量用いて予備抽出してなる請求項17記載のポリフェノール類。

【請求項19】 予備抽出した残りの植物体の重量に対して、5～30倍量の溶媒を用いて抽出してなる請求項17記載のポリフェノール類。

【請求項20】 無機酸で予備抽出したのち、無機酸を水洗除去して20～60体積%のエタノール水溶液またはアセトン水溶液で抽出してなる請求項17記載のポリフェノール類。

【請求項21】 無機酸を含む水の無機酸濃度が0.1～1重量%である請求項17または請求項20記載のポリフェノール類。

【請求項22】 0～80℃の水で予備抽出してなる請求項17記載のポリフェノール類。

【請求項23】 予備抽出した残りの植物体より、無機酸、有機酸、および還元剤から選択される少なくとも1種を含む溶媒により抽出してなる請求項22記載のポリフェノール類。

【請求項24】 無機酸が、塩酸、磷酸、亜硫酸、硫酸、および硝酸から選択される少なくとも1種である請求項17、請求項20、請求項21、または請求項23記載のポリフェノール類。

【請求項25】 有機酸が、酢酸、クエン酸、コハク酸、乳酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、これら有機酸のナトリウム塩およびカリウム塩から選択される少なくとも1種である請求項23記載のポリフェノール類。

【請求項26】 還元剤が、アスコルビン酸、エリスロニン酸、およびそれらの塩から選択される少なくとも1

1種である請求項23記載のポリフェノール類。

【請求項27】 植物体が、茶葉、ピーナッツ内皮、玉葱の皮、エビスグサ、ギシギシ、ソバ殻、ゲンノショウコ、ブドウの皮、ヒシの実、シナモン、ビンロウジュ、貴衆から選択される少なくとも1種である請求項17記載のポリフェノール類。

【請求項28】 植物体が緑茶、ウーロン茶、および紅茶から選択される少なくとも1種の茶葉である請求項27記載のポリフェノール類。

【請求項29】 ポリフェノール類を含む植物体を水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出し、更にケイ酸マグネシウム、ケイ酸カルシウム、およびケイ酸アルミニウムから選択される少なくとも1種のケイ酸塩で処理して得られるポリフェノール類。

【請求項30】 ポリフェノール類を含む植物体を、無機酸を含む水、および／または水で予備抽出した残りの植物体より、水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出し、更にケイ酸マグネシウム、ケイ酸カルシウム、およびケイ酸アルミニウムから選択される少なくとも1種のケイ酸塩で処理して得られるポリフェノール類。

【請求項31】 抽出液にケイ酸塩を加えたものを攪拌したのち濾過してなる請求項29または請求項30記載の記載のポリフェノール類。

【請求項32】 抽出液を、ケイ酸塩を濾過装置の濾材の上に敷いたところへ流し込んで濾過してなる請求項29または請求項30記載のポリフェノール類。

【請求項33】 ポリフェノール類を含む植物体を、無機酸を含む水、および／または水で予備抽出した残りの植物体より、水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出して得られる植物エキス。

【請求項34】 無機酸を含む水および／または水を植物体の重量に対して3～50倍量用いて予備抽出してなる請求項33記載の植物エキス。

【請求項35】 予備抽出した残りの植物体の重量に対して、5～30倍量の溶媒を用いて抽出してなる請求項33記載の植物エキス。

【請求項36】 無機酸で予備抽出したのち、無機酸を水洗除去して20～60体積%のエタノール水溶液またはアセトン水溶液で抽出してなる請求項33記載の植物エキス。

【請求項37】 無機酸を含む水の無機酸濃度が0.1～1重量%である請求項33または請求項36記載の植物エキス。

【請求項38】 0～80℃の水で予備抽出してなる請求項33記載の植物エキス。

【請求項39】 予備抽出した残りの植物体より、無機

酸、有機酸、および還元剤から選択される少なくとも1種を含む溶媒により抽出してなる請求項38記載の植物エキス。

【請求項40】 無機酸が、塩酸、磷酸、亜硫酸、硫酸、および硝酸から選択される少なくとも1種である請求項33、請求項36、請求項37、または請求項39記載の植物エキス。

【請求項41】 有機酸が、酢酸、クエン酸、コハク酸、乳酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、これら有機酸のナトリウム塩およびカリウム塩から選択される少なくとも1種である請求項39記載の植物エキス。

【請求項42】 還元剤が、アスコルビン酸、エリスロニン酸、およびそれらの塩から選択される少なくとも1種である請求項39記載の植物エキス。

【請求項43】 植物体が、茶葉、ピーナッツ内皮、玉葱の皮、エビスグサ、ギシギシ、ソバ殻、ゲンノショウコ、ブドウの皮、ヒシの実、シナモン、ビンロウジュ、貴衆から選択される少なくとも1種である請求項33記載の植物エキス。

【請求項44】 植物体が緑茶、ウーロン茶、および紅茶から選択される少なくとも1種の茶葉である請求項43記載の植物エキス。

【請求項45】 ポリフェノール類を含む植物体を水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出し、更にケイ酸マグネシウム、ケイ酸カルシウム、およびケイ酸アルミニウムから選択される少なくとも1種のケイ酸塩で処理して得られる植物エキス。

【請求項46】 ポリフェノール類を含む植物体を、無機酸を含む水、および／または水で予備抽出した残りの植物体より、水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出し、更にケイ酸マグネシウム、ケイ酸カルシウム、およびケイ酸アルミニウムから選択される少なくとも1種のケイ酸塩で処理して得られる植物エキス。

【請求項47】 抽出液にケイ酸塩を加えたものを攪拌したのち濾過してなる請求項45または請求項46記載の記載の植物エキス。

【請求項48】 抽出液を、ケイ酸塩を濾過装置の濾材の上に敷いたところへ流し込んで濾過してなる請求項45または請求項46記載の植物エキス。

【請求項49】 核酸旨味成分と請求項1～16のいずれかに記載の高活性核酸旨味成分保持剤とを含有する食品。

【請求項50】 食肉、その干物、家禽卵加工品、漬物、ハム・ソーセージ、マヨネーズ、たらこ、辛子明太子、すり身、大豆蛋白含有食品、魚介塩辛、および魚介干物から選択される少なくとも1種である請求項49記載の食品。

【請求項51】 核酸旨味成分保持剤を含む植物体を、無機酸を含む水、および／または水で予備抽出し、この予備抽出液を除去後、残りの植物体より、水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出分離することを特徴とする高活性核酸旨味成分保持剤の製造方法。

【請求項52】 核酸旨味成分保持剤を含む植物体を水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出分離し、更にケイ酸マグネシウム、ケイ酸カルシウム、およびケイ酸アルミニウムから選択される少なくとも1種のケイ酸塩で処理することを特徴とする高活性核酸旨味成分保持剤の製造方法。

【請求項53】 核酸旨味成分保持剤を含む植物体を、無機酸を含む水、および／または水で予備抽出し、この予備抽出液を除去後、残りの植物体より、水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出分離し、更にケイ酸マグネシウム、ケイ酸カルシウム、およびケイ酸アルミニウムから選択される少なくとも1種のケイ酸塩で処理することを特徴とする高活性核酸旨味成分保持剤の製造方法。

【請求項54】 ポリフェノール類を含む植物体を、無機酸を含む水、および／または水で予備抽出し、この予備抽出液を除去後、残りの植物体より、水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出分離することを特徴とするポリフェノール類の製造方法。

【請求項55】 ポリフェノール類を含む植物体を水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出分離し、更にケイ酸マグネシウム、ケイ酸カルシウム、およびケイ酸アルミニウムから選択される少なくとも1種のケイ酸塩で処理することを特徴とするポリフェノール類の製造方法。

【請求項56】 ポリフェノール類を含む植物体を、無機酸を含む水、および／または水で予備抽出し、この予備抽出液を除去後、残りの植物体より、水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出分離し、更にケイ酸マグネシウム、ケイ酸カルシウム、およびケイ酸アルミニウムから選択される少なくとも1種のケイ酸塩で処理することを特徴とするポリフェノール類の製造方法。

【請求項57】 ポリフェノール類を含む植物体を、無機酸を含む水、および／または水で予備抽出し、この予備抽出液を除去後、残りの植物体より、水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出分離する

ことを特徴とする植物エキスの製造方法。

【請求項58】 ポリフェノール類を含む植物体を水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出分離し、更にケイ酸マグネシウム、ケイ酸カルシウム、およびケイ酸アルミニウムから選択される少なくとも1種のケイ酸塩で処理することを特徴とする植物エキスの製造方法。

【請求項59】 ポリフェノール類を含む植物体を、無機酸を含む水、および／または水で予備抽出し、この予備抽出液を除去後、残りの植物体より、水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、およびアセトン水溶液から選択される少なくとも1種の溶媒で抽出分離し、更にケイ酸マグネシウム、ケイ酸カルシウム、およびケイ酸アルミニウムから選択される少なくとも1種のケイ酸塩で処理することを特徴とする植物エキスの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、食品に元来含まれていたり、核酸旨味成分分解酵素を含む食品に添加される、イノシン酸等の核酸構造を有する旨味成分を安定化するのに有効であり、高活性で、しかも淡色の核酸旨味成分保持剤、種々の生理活性を有する高純度ポリフェノール類、および前記ポリフェノール類を高含量で含有し、かつ着色度の低い植物エキス、並びにそれらの製造方法に関する。さらに詳しくは、前記核酸旨味成分保持剤は、畜肉、家禽肉、魚介肉等の食肉やその干物、野菜類、およびそれらの加工品、漬物、すり身、味噌、ハム・ソーセージ、マヨネーズ、たらこ・辛子明太子、大豆蛋白含有食品、魚介塩辛、魚介干物等の食品が元来有しているか、あるいはこれらの食品に添加される核酸調味料由来の旨味成分であるイノシン酸（以下、IMPと称す。）、グアニル酸（以下、GMPと称す。）等の5'リボヌクレオチドが核酸旨味成分分解酵素である5'リボヌクレオチダーゼにより分解されることを防止して、食品中に旨味成分を蓄積し、味の劣化を防止しうるものである。また、前記ポリフェノール類は、血中コレステロール濃度上昇抑制作用、抗腫瘍作用、血圧降下作用、血糖降下作用、抗酸化作用、抗菌作用等種々の生理活性を有するものである。さらに、前記植物エキスは、前記ポリフェノール類を有する茶等の植物体より得られ、ポリフェノール類含有量が高い植物エキスである。

【0002】

【従来の技術】畜肉、家禽肉、もしくは魚介肉等の食肉、野菜類、卵、およびそれらの加工品であるハム・ソーセージ、すり身、味噌、醤油、漬物、辛子明太子、大豆蛋白含有食品、魚介塩辛、魚介干物等の食品の加工工程中、またはこれらの食品中に核酸旨味成分である5'リボヌクレオチドを含有する調味料を使用する場合、

5' リボヌクレオチダーゼ活性があると調味料中または食品中の5' リボヌクレオチドが加水分解され、味の劣化が生じる。これを防止すべく例えば、漬物の製造のように、殺菌の目的も含め野菜中の酵素を加熱処理で失活させることが行われている。しかし、加熱処理を行うと、風味や食感が低下することから、過剰な加熱処理は行うことができず、5' リボヌクレオチダーゼ活性が残存する。また、浅漬け漬物等は加熱処理はしない。従って、漬物に5' リボヌクレオチドを加えると、漬物野菜や微生物に由来する5' リボヌクレオチダーゼの影響で5' リボヌクレオチドが分解されて旨味がなくなる。そこで、5' リボヌクレオチダーゼ活性を抑制して5' リボヌクレオチドの分解を防止すれば、これらの食品や調味料の味の劣化を防止することができる。

【0003】5' リボヌクレオチダーゼの活性を抑制して5' リボヌクレオチドの分解を防止する方法としては、冷凍、冷蔵により食品の温度を低く保って活性を抑制する方法がある。それ以外にも、特公昭45-8619号公報にはエチレンジアミン四酢酸鉛または高分子リン酸塩で処理する方法、特開昭61-268129号公報には重合リン酸塩および可食性有機酸塩で処理する方法が示されている。しかしながら、食品を冷凍、冷蔵することで温度を低く保つという方法では、冷凍、冷蔵のための設備投資が必要となり、コスト、設備面積等に問題がある。しかも、5' リボヌクレオチダーゼの種類によっては、冷蔵中にも作用するものもあり、しかも、保存中に冷凍や冷蔵によって食品自体が劣化するという問題もある。また、エチレンジアミン四酢酸鉛やリン酸塩を利用する方法では、処理法が複雑で実用的に十分満足するものとは言えない。

【0004】一方、5' リボヌクレオチダーゼ阻害剤をこれら旨味成分の劣化防止に利用するという方法も数多く提案されている。例えば、特公昭45-18263号公報には、ヌクレオシド-5'-リン酸エステル分解酵素を含有する食品に、キンミズヒキの親水性有機溶媒抽出液に非親水性有機溶媒を添加して得られる沈殿物を添加して均一に分散させることを特徴とするヌクレオシド-5'-リン酸エステル類が安定に含有された食品の製造法が、特公昭45-20542号公報には、ヌクレオシド-5'-リン酸エステル分解酵素を含有する食品に、サングイソルバ・オフィシナリス・リンネの親水性有機溶媒抽出液に非親水性有機溶媒を添加して得られる沈殿物を添加して均一に分散させることを特徴とするヌクレオシド-5'-リン酸エステル類が安定に含有された食品の製造法が、特公昭45-20544号公報には、ヌクレオシド-5'-リン酸エステル分解酵素を含有する食品に、コケモモの葉の親水性有機溶媒抽出液に非親水性有機溶媒を添加して得られる沈殿物を添加して均一に分散させることを特徴とするヌクレオシド-5'-リン酸エステル類が安定に含有された食品の製造法

が、特公昭45-20545号公報には、ヌクレオシド-5'-リン酸エステル分解酵素を含有する食品に、シンナモム・カシア・ニースの親水性有機溶媒抽出液に非親水性有機溶媒を添加して得られる沈殿物を添加して均一に分散させることを特徴とするヌクレオシド-5'-リン酸エステル類が安定に含有された食品の製造法が、特公昭45-20546号公報には、ヌクレオシド-5'-リン酸エステル分解酵素を含有する食品に、ウンカビリア・ガンビール・ロクスブルギの葉の親水性有機溶媒抽出液に非親水性有機溶媒を添加して得られる沈殿物を添加して均一に分散させることを特徴とするヌクレオシド-5'-リン酸エステル類が安定に含有された食品の製造法が、特公昭45-20547号公報には、ヌクレオシド-5'-リン酸エステル分解酵素を含有する食品に、ビンロウジュの種子の親水性有機溶媒抽出液に非親水性有機溶媒を添加して得られる沈殿物を添加して均一に分散させることを特徴とするヌクレオシド-5'-リン酸エステル類が安定に含有された食品の製造法が、特公昭45-20548号公報には、ヌクレオシド-5'-リン酸エステル分解酵素を含有する食品に、レウム・パルマートウム・リンネ・パリエータス・タンゲテイクム・マグシモウィッチの根茎の親水性有機溶媒抽出液に非親水性有機溶媒を添加して得られる沈殿物を添加して均一に分散させることを特徴とするヌクレオシド-5'-リン酸エステル類が安定に含有された食品の製造法が、それぞれ開示されている。さらには、特開平2-84141号公報には、ブドウの皮の親水性溶媒抽出物を有効成分とする食品旨味成分保存料が、特開平2-84148号にはヒシの実の親水性溶媒抽出物を有効成分とする食品旨味成分保存料が、特開平2-167050号公報には、ビンロウジュや貫衆の親水性溶媒抽出物を有効成分とする食品旨味成分保存料がそれぞれ開示されている。しかし、このような5' リボヌクレオチダーゼ阻害剤による旨味成分劣化防止技術では、阻害剤の供給面、価格、阻害活性の強さ等により実用化しにくい面がある等の問題がある。

【0005】そこで、本発明者等は、安価で且つ安定供給可能である茶抽出物、ピーナッツ内皮抽出物、玉葱の皮抽出物、ギンギシ抽出物、ソバ殻抽出物等が、強い5' リボヌクレオチダーゼ阻害活性を示し、核酸旨味成分保持剤となる事を見出した（特開平7-289197号公報）。また、本発明におけるポリフェノール類とは、カテキン、タンニン、フラボン、アントシアニン等、一分子中にいくつかのフェノール性水酸基を有する化合物群のことであるが、これらは各種植物に多く含有され、中でも茶葉中に含まれるポリフェノール類は、抗酸化作用を初め多くの生理活性を有している。このポリフェノール類の精製法としては、親水性溶媒での抽出後溶媒分画による方法が以前より知られており、これ以外にも有機系樹脂への吸着・脱離による方法がよく知られ

10

20

30

40

50

ている。ここでいう茶葉中に含まれるポリフェノール類とは、主にエピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレートである。

【0006】さらに、本発明における植物エキ스는、上記のようなポリフェノール類を含む植物体より得られるポリフェノール含有エキスであり、従来は、単なる溶媒抽出、溶媒分画、樹脂による吸着・脱離等の方法で精製されていた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】核酸旨味成分保持剤である植物体抽出物は、従来のように単に溶媒等で抽出して得られた場合には、概ね活性はあまり高くなく色調も問題となる。例えば茶抽出物の場合、単に茶葉を熱水やエタノール水溶液で抽出しただけでは、あまり高い5'リボヌクレオチダーゼ阻害活性、つまり核酸旨味成分保持効果を有するものを得られるとはいえず、色合いも濃い黄色や赤褐色となる。そのために、食品で十分な阻害効果を発揮させるには、対象食品によっては抽出物の添加量が多くなり、溶解性、着色度、食品作製時の煩雑さ、流通時での嵩高さ等が問題となる可能性があり、単位量当たりの阻害活性を一層高める事が望ましかった。さらに元々着色していることから食品がその色に染まる可能性があり、例えば漬物に茶抽出物を加えると、漬物野菜が、赤褐色に変色したり、野菜が暗い色になって、野菜本来のみずみずしい色が失われる問題があった。この問題が起こると、漬物を数メートル離れて見ると、漬物が色の悪い肉のように見えて商品価値が低下する。従って、茶抽出物の色調 (tone) 改善が望まれていた。この色調は、色差計 (Color meter) によって、明るさ-暗さ成分の指標 L (light to dark color components、Brightness)、赤-緑の指標である a 値 (a 値が高いと赤)、黄-青色の指標では b 値 (b 値が高いと黄色) の改善によって評価できる。従って、L 値が高く、色相 (Hue) の指標である a 値、b 値がゼロに近いことが好ましい。さらにより好ましくは、上記茶抽出物の色調の改善と、阻害活性の向上による核酸旨味成分保持剤の添加量の低減とにより、さらに色調の改善を行うことが望まれていた。

【0008】このような茶抽出物の変色原因物質を除去する方法として、無機系凝集剤、活性炭をはじめ各種の樹脂が提案されているが、このような樹脂を利用すると色調は改善されるものの、阻害活性成分も同時に吸着除去されてしまう。また、脱色剤を使用することも考えられるが、安全面から脱色剤の残留が懸念され好ましくない。茶抽出物以外の植物体抽出物の場合もほぼ同様のことがいえる。

【0009】一方、5'リボヌクレオチダーゼ阻害活性、つまり核酸旨味成分保持効果の大部分を担っていると思われるポリフェノール類を茶葉等の植物体抽出物より精製する既存法は、溶媒分画の場合には、精留塔を含

む多大な装置の必要性、操作の煩雑さ、溶媒残存の可能性、コスト高等の問題があり、また、有機系樹脂による精製の場合には、樹脂塔等の多大な装置の必要性、操作の煩雑さ、コスト高等の問題があった。また、このことは、上記5'リボヌクレオチダーゼ阻害剤の活性向上、着色度低減をめざし、溶媒分画、有機系樹脂による精製法を使用した場合も同様である。また、核酸旨味成分保持効果、その他生理活性を有するポリフェノール含有植物エキスについても、その精製には上記と同様の問題がある。

【0010】本発明は、上記のような従来における、茶葉等の植物体からの抽出物の5'リボヌクレオチダーゼ阻害活性向上、つまり核酸旨味成分保持効果向上、色調の改善という問題点に鑑み、各種漬物、味噌、辛子明太子など、5'リボヌクレオチダーゼ活性を有する食品に添加することでイノシン酸の分解を阻害して、旨味を保持する核酸旨味成分保持剤として、5'リボヌクレオチダーゼ阻害活性が高く、かつ色調が改善された核酸旨味成分保持剤を提供せんとするものである。

【0011】また、本発明は、従来、多大な装置、煩雑な処方、高いコストにより精製されていた、茶等の植物由来のポリフェノール類、及び該ポリフェノールを含有する植物エキスとして、より簡便で、単純な装置、低いコストにより精製される高純度ポリフェノール類、及び該ポリフェノールを高含量で含有する植物エキスを提供することである。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明は、茶葉等、核酸旨味成分保持剤を含む植物体からの抽出物の5'リボヌクレオチダーゼ阻害活性の向上、ポリフェノール類を含む植物体からの抽出物の純度向上、およびこれら抽出物の色調を改善する目的で、植物体を水、無機酸を含む水、または無機酸を含む水と水とで予備抽出した後、残りの植物体を水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、またはアセトン水溶液等の溶媒で抽出するというものである。特に好ましいものは、塩酸で予備抽出後、塩酸を水洗除去して、20~60体積%、より好ましくは30~50体積%のエタノール水溶液で抽出したものである。また、水のみにより予備抽出したものでは、抽出溶媒である水、エタノール、アセトン、エタノール水溶液、またはアセトン水溶液に有機酸、無機酸、還元剤を添加しておくことが好ましい。

【0013】また、茶葉等の植物体を溶媒で抽出後、得られた抽出液をケイ酸マグネシウム、ケイ酸カルシウム、もしくはケイ酸アルミニウム等のケイ酸で処理することにより、蛋白等の夾雑物とともにカフェインが除去され、ポリフェノール類の純度が向上し、5'リボヌクレオチダーゼ阻害活性が向上する。具体的には、植物体を溶媒で抽出後、得られた抽出液にケイ酸マグネシウム、ケイ酸カルシウム、もしくはケイ酸アルミニウム等

のケイ酸を加えて1～2時間攪拌したのち濾過するか、あるいは抽出液を、前記ケイ酸塩を濾過装置の濾紙もしくは濾布上に敷いたところへ流し込み濾過する。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明でいう核酸旨味成分保持剤を含む植物体、およびポリフェノール類を含む植物体としては、茶葉、ピーナッツ内皮、玉葱の皮、エビスグサ、ギンギシ、ソバ殻、ゲンノショウコ、ブドウの皮、ヒシの実、シナモン、ビンロウジュ、貫衆等が挙げられる。

【0015】本発明で使用する茶葉について説明する。本発明では、乾燥した任意の原料茶葉を用いることができる。例えば、番茶、焙じ茶などの緑茶のような不発酵茶、ウーロン茶のような半発酵茶、または紅茶のような発酵茶、さらにはこれらの任意の望ましい混合物を使用することが出来る。緑茶は、茶葉中のポリフェノールを酸化させずに製造されており、ウーロン茶、紅茶と比較して最も天然茶葉に近い組成をしている。緑茶は、典型的には、抽出液が黄緑色をしている。

【0016】ウーロン茶は、茶葉中のポリフェノールが13～30%酸化されており、典型的には、抽出液は黄色がかった色からオレンジ色である。その茶葉は、赤味がかった緑である。前記紅茶は、茶葉中のポリフェノールが80%以上酸化されており、茶葉は暗い赤色をしている。

【0017】これらの茶葉からの抽出液の色相(Hue)は、茶の質および茶葉乾燥時の加熱条件によって異なる。また、抽出物の明るさ(brightness)も抽出操作の時間によって異なる。これらの中でも緑茶は、ポリフェノール類が酸化されて濃い色相になっておらず、他の茶抽出物と比較して明るく特に好ましい。本発明では、茶葉を製品にする過程で出来る粉や茶くずも使用できる。

【0018】本発明で植物体の予備抽出および抽出に利用する無機酸としては、塩酸、磷酸、亜硫酸、硫酸および硝酸が適する。特に、塩酸は、予備抽出による除去、乾燥操作が容易であり特に好ましい。茶葉における予備抽出時、水での予備抽出の場合、茶葉に対して、重量で3倍量から50倍量の0～80℃の予備抽出水を加える。50倍量以上、80℃以上の場合には目的とする活性成分、ポリフェノール類が予備抽出時に幾分抽出され、その後の本抽出時における目的物の抽出収率が低下する。茶葉以外の植物体の場合も水での予備抽出に関しては、ほぼ同様の条件が好ましい。予備抽出水は通常の水だけでも良いが、予備抽出液のpHが3未満になるように無機酸を加えるのがより好ましく、予備抽出液中に0.1～1重量%含むのが好ましい。その後、予備抽出後のpHを3以上にするために、水で十分に洗浄する。これは、特に茶葉の場合、抽出操作終了後pH3未満で濃縮を行うと、工程上、腐食の問題がある上、色調にとっても好ましくない可能性がある。一方、溶液のpHを

高くするためには、水での洗浄回数が増えて、洗浄により、回収量が減少するので好ましくない。従って、洗浄後のpHは、好ましくはpH3.0～5.0、より好ましくは、pH3.0～4.0に調製することが好ましい。また、予備抽出水量を減少させる目的で、無機酸溶液を除去後、水酸化ナトリウムやアルギニンによって酸を中和することでも色調の改善が可能であるが、アルカリが局所的に茶成分のポリマー化の原因となり性能の向上が十分でないことがある。次に、濃縮を行う過程である程度濃縮し、一定の温度にするとゲル状の成分を生じるが、この場合、濃縮途中で濾過によりゲル状の成分を除去すると色調が更に良くなる。ここである程度の濃縮とは10倍以上、好ましくは20～40倍の濃縮であり、一定の温度とは50℃以下、好ましくは10～25℃である。

【0019】本発明において、無機酸を含む予備抽出液によって抽出物の色調が改善される理由は明らかでない。しかし、茶葉等の植物体には、アルミニウム、鉄、カルシウムなど、重金属が含まれていること、重金属は、酸性条件下で可溶化すること、この重金属が、茶葉に含まれるカテキン類等、植物体中のポリフェノール類と結合して、沈澱を発生し、色調が暗くなると考えられることから、これらの重金属が、無機酸によって、可溶化し、その後の無機酸溶液の除去、および水洗によって除去されるものと考えられる。このように、無機酸で予備抽出することで、茶葉に含まれていた重金属が除去された結果、抽出物の色調が改善され则认为られる。

【0020】本発明において、予め無機酸や水による予備抽出を行うことで抽出物の5'リボヌクレオチダーゼ阻害活性つまり核酸旨味成分保持効果が向上する理由は明らかでない。しかし、予備抽出により阻害活性の無い蛋白、多糖類、無機物、その他水溶性成分が茶葉等の植物体中から除去され、ポリフェノール類等の活性成分が濃縮されるものと思われる。また、無機酸で予備抽出する場合には、ガレート類のフェノール性水酸基に結合した重金属が除去された結果、抽出物中の有効なフェノール性水酸基の量が増えるものと考えられる。

【0021】本発明において、無機酸および/または水による予備抽出を経て得られたポリフェノール類の純度は、80%以上を有している。このように、抽出物中のポリフェノール類の純度が高められる理由は明らかでないが、前記と同様の理由によるものと考えられる。本発明では、予備抽出後、残りの植物体よりさらに抽出を行う。その時、植物体に対して、重量で5倍量から30倍量、好ましくは、8倍量から15倍量の抽出溶媒を加える。抽出は、通常は5分以上、好ましくは20分から12時間行うが、必要に応じて攪拌、振とう等の補助的な手段を加えることにより抽出時間を短縮することができる。

【0022】予備抽出に水を使用する場合には、予備抽

出後の抽出溶媒に無機酸、有機酸、還元剤を含む事がより好ましい。ここで利用できる有機酸としては、酢酸、クエン酸、コハク酸、乳酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸およびこれらのナトリウム塩、カリウム塩などが挙げられる。この有機酸は1種類でも、また2種類以上を混合してもよいが、クエン酸およびそのナトリウム塩が特に好ましい。本発明で利用できる還元剤としては、食品に使用できるものならば特に制限はないが、アスコルビン酸、エリスロニン酸および、アスコルビン酸、エリスロニン酸のナトリウム、カリウム塩の少なくとも1種以上を選択することが好ましい。

【0023】本発明において、無機酸による予備抽出を行わず水による予備抽出を行い、残りの植物体からそのまま抽出した場合には、色調は若干低下するがポリフェノールの含量の高いサンプルが得られる。色調をより良くする目的のためには、無機酸、有機酸、還元剤の少なくとも1種以上を含む溶媒で抽出することが効果的である。本発明のように予備抽出は行わず、塩酸、硫酸などの無機酸、クエン酸などの有機酸、アスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、エリスロニン酸ナトリウムなどの還元剤を溶媒に添加して抽出すると、色調は改善されるが、5' リボヌクレオチダーゼ阻害活性等の性能が向上しないので好ましくない。従って、このような場合には、水洗浄の後、無機酸、有機酸、還元剤の少なくとも1種以上を含む溶媒で抽出することが好ましい。さらに無機酸、有機酸、還元剤を加えた溶媒は、熱湯の場合には性能の改善が十分でないのに対し、アルコール水抽出を行うと、性能が改善するのでより好ましい。

【0024】本発明において、水による抽出後、無機酸、有機酸、還元剤を含む抽出溶媒で抽出すると色調が改善されるのは、これらの成分が抽出時のpHを低下させたり、茶抽出成分の酸化に伴う自動酸化を阻害するものと考えられる。つまり、植物体抽出物に含まれるポリフェノール類の自動酸化、抽出物に含まれるアミノ酸と糖類とのメイラード反応が、pHが中性に近づくと起こるものと推定されている。従って、水洗浄によって、可溶性のアミノ酸や糖類が除去され、無機酸、有機酸が抽出溶媒のpHを若干低下させることで、抽出物の酸化、メイラード反応を阻害していると考えられる。また、還元剤は、pHの調節作用もあるが、自動酸化反応を阻害しているものと考えられる。

【0025】予備抽出後の抽出時に水を使用する場合には熱湯を使用するのが好ましく、80℃以上の温度のものが好ましい。また、エタノール水溶液、もしくはアセトン水溶液を使用する場合は、20体積%～60体積%のアルコール水溶液もしくはアセトン水溶液が好ましく、30～50体積%のものがより好ましい。さらには、熱湯とエタノール水溶液を比較した場合、エタノール水溶液のほうが性能が向上するのでより好ましい。

【0026】本発明において、茶葉抽出の場合、熱湯抽

出よりも、アルコール水抽出によって性能の向上が見られる理由は明らかでない。しかし、アルコール水抽出では、アルコール濃度が高くなるに従って、抽出物に含まれるエピカテキンガレートや、エピガロカテキンガレートの組成比率が高くなり、それに伴って阻害活性が増加した。従って、これらのガレートが阻害活性に関与していると推定される。また、1時間熱湯抽出よりも40%アルコール水で4時間抽出したほうがガレートの濃度が高くなっており、アルコール水抽出によってこのガレート類が抽出され易くなるものと考えられる。

【0027】また、茶葉等の植物体を溶媒で抽出後、得られた抽出液をケイ酸マグネシウム、ケイ酸カルシウム、もしくはケイ酸アルミニウム等のケイ酸で処理することで蛋白等の夾雑物とともにカフェインが除去され、ポリフェノール類の純度が向上し、5' リボヌクレオチダーゼ阻害活性を向上するのは、ケイ酸塩にカフェインが選択的に吸着し、除去されることによると考えられる。なお、このケイ酸塩による効果は、水、無機酸を含む水で予備抽出せず、水、アセトン、エタノール、エタノール水溶液、またはアセトン水溶液で抽出した場合でも得られるが、予備抽出した場合の方がより効果的である。ケイ酸マグネシウム、ケイ酸カルシウム、ケイ酸アルミニウムの具体的例としては、これらを含む活性白土（ナカライテスク株式会社製）やケイ酸マグネシウム（商品名ミズカライフF；水澤化学工業株式会社製）等が挙げられる。

【0028】本発明の核酸旨味成分保持剤は、5' リボヌクレオチダーゼ活性を有する食品には、制限なく使用することができ、添加に伴う色調の変化を抑制可能である。本発明の核酸旨味成分保持剤は、通常の抽出物と比較して色調が薄いので、これまでのように濃い色調でない食品にも使用可能である。この食品の用途としては、漬物、味噌、芥子明太子、食肉、すり身、ハム・ソーセージ、マヨネーズ、たらこ、魚介塩辛、大豆蛋白食品などが挙げられる。漬物とは、野菜（白菜、ナス、ダイコン、キュウリ、カブ、グリーンボール、ウリ、ショウガ、梅、高菜など）、果実（メロン）、きのこ、海藻等を材料として、塩、しょう油、みそ、粕、こうじ、酢、ぬか、からし、もろみ、その他調味料に漬け込んだものをいう。一般には、漬け込みに使用した主たる調味料により分けられ、塩漬、しょうゆ漬、みそ漬、粕漬、こうじ漬、酢漬、ぬか漬、もろみ漬、辛子漬、糖漬その他などに分けられる。本発明の核酸旨味成分保持剤は、これらの漬物の中で、漬物原料あるいは微生物に由来する5' リボヌクレオチダーゼを有する漬物において好ましく用いることができる。例えば、梅漬、梅干し、小粒梅、かつお梅干、つぼ漬、野沢漬、高菜漬、カリカリ梅、茄子一本漬、福神漬、しば漬、山菜しょうゆ漬・キュウリしょうゆ漬・キュウリー一本漬のような各種野菜の醤油漬、山菜みそ漬、奈良漬、わさび漬、山海漬、べ

ったら漬、千枚漬、らっきょう漬、しょうがの酢漬け、はりはり漬、古漬けたくあん、新漬けたくあん、きゅうりもろみ漬、こなすもろみ漬、辛子漬、ふき辛子漬などが挙げられる。キムチは、野菜を唐辛子を主とした調味料に漬け込んだ漬物の総称で、その数は百種類以上もあるが、なかでも代表的な白菜キムチ、モランボン式、中川式、水産物の塩漬けも幅広く使用した韓国キムチが含まれる。惣菜風漬物は、漬物であるが、シナチクやキクラゲを入れている。その他、上記以外の物であるサワークラフトもこの範疇に含まれる。また、調味料の種類とは別に、漬物の作製日数により、一夜漬けもしくは浅漬けと呼ばれる原料の野菜などを塩蔵後、調味液と混合後、数日以内に販売して食に供する漬物と、漬物製造後、数週間から数カ月食に供することができるように加工した古漬けがあるが、これらに関係なく核酸旨味成分保持剤を使用することができる。

【0029】味噌は、大豆の発酵物であり、生味噌、ダシ入り味噌に大別される。味噌の5'リボヌクレオチダーゼは、麹、微生物由来で分解すると推定されるが、本発明の核酸旨味成分保持剤は、このような味噌にも適用可能である。辛子明太子は、明太子を唐辛子を主とした調味料に漬け込んだものである。食肉は、牛、豚、兎等から得られる畜肉、鶏等から得られる家禽肉、魚、貝等から得られる魚介肉である。

【0030】すり身とは、魚肉を塩とともに、魚肉タンパクを塩析させて変成させてゲル状に形成したものであり、蒲鉾やはんぺん等に用いることができる。ハムは、豚肉等を食塩、亜硝酸塩、庶糖等を含む調味液に漬けて味付け後、燻煙、湯煮をしたものである。またソーセージとは、牛、豚、羊、魚等の肉類を細碎、調味してケーシングに詰め、乾燥、燻煙したものである。

【0031】マヨネーズは、サラダ油等の油類と酢、卵黄を混合、乳化したものである。たらこは、スケトウタラの卵を色素、食塩、調味料等で味付けしたものである。魚介塩辛とは、魚肉、内臓等を、食塩や核酸等の調味料とともに一定期間、漬け込んだり、あるいは醗酵させたものである。

【0032】大豆蛋白含有食品とは、粉状もしくは粒状の大豆蛋白を含有する食品であり、ギョウザ、ハンバーグ等の惣菜、冷凍食品、チルド食品等がある。本発明の核酸旨味成分保持剤は、最終製品当たり0.03~0.6重量%となるように添加されるが、0.05~0.3重量%となるように添加するのが特に好ましい。添加時期は、漬物の場合、常法により漬物原料を塩蔵を行った後、調味液と混合する際に溶解してもよく、また、塩蔵終了後、調味液を添加するまでの段階で添加して、その後、調味液と混合してもよいし、さらには、塩蔵終了後と調味液添加時との両方の時点で添加してもよい。

【0033】本発明の核酸旨味成分保持剤には、さらに、色調保持剤、性能補助剤、溶解補助剤等を添加しても

良い。色調保持剤とは、核酸旨味成分を食品に添加した後、徐々に進む色調の変化を防止する添加剤であり、可食性の有機酸、無機酸、還元剤が挙げられる。性能補助剤とは、阻害活性を調整する目的の添加剤であり、タンニン酸や、他の抽出方法で得た茶葉その他の植物抽出物が挙げられる。この時、性能補助剤は、色の薄いものが好ましく、例えば、タンニン酸等が好ましい。溶解補助剤とは、茶抽出物の溶解度を高める添加剤であり、トレハロース、ソルビトール、シクロデキストリン等が挙げられる。色調保持剤および溶解補助剤の混合比率としては、本発明の抽出物の固形分換算100重量部に対して、0.5~200重量部添加しても良く、より好ましくは1~50重量部である。また、性能補助剤の混合比率としては、抽出物の固形分換算100重量部に対して、5~50重量部添加しても良い。また、本発明の核酸旨味成分保持剤には、グルタミン酸ソーダ、イノシン酸、食塩、糖類、天然調味料、着色料、磷酸塩、EDTAなどを添加してもよい。

【0034】

【発明の効果】本発明の核酸旨味成分保持剤を用いて、5'リボヌクレオチダーゼを含有する野菜や海産物等を食品として処理した場合には、イノシン酸等の核酸旨味成分が安定化され、しかも、この保持剤は色も薄く、安価であり、漬物、味噌、辛子明太子などの旨味向上に非常に有効なものである。また、本発明によれば、前記核酸旨味成分保持剤、並びに、一般に血中コレステロール低下作用、血圧上昇抑制作用、血糖降下作用、抗酸化作用、抗菌作用を有しているといわれるポリフェノール類、さらにはこのポリフェノール類を高含量で含有する植物エキスを簡便、且つ安価に高純度で得られる。

【0035】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものでない。

(実施例1) 原料茶葉は、飲料用茶葉製造工程で廃物として得られた中国産粉茶を用いた。この粉茶20gを共栓付三角フラスコ(500ml容量)に入れ、6gの濃塩酸を含む200mlの希塩酸溶液を加えて10分間振とうした。その後、容器を転倒させ、希塩酸溶液を除いた。次に、前記容器内の茶葉に200mlの水を加え5分間振とう後、容器を転倒させ、液を除去した。これを5回繰り返した。さらに、前記容器内の茶葉に300mlの40%エタノール水を加えて1時間室温で振とうして抽出を行った。抽出終了後、ただちにヌツチェを用いて、減圧濾過し、濾過後の吸引瓶中の抽出液をナス型フラスコに移し、エバポレーターで濃縮した。これをさらに、真空乾燥器で約20時間乾燥した。

(実施例2) 実施例1におけるエバポレーターによる濃縮時、20倍濃縮した後、15℃に保ち生じたゲル状物を濾過により除去した後、更に濃縮、真空乾燥器で約20時間乾燥した他は、実施例1と全く同様にした。

(実施例3) 実施例1における6gの濃塩酸を含む200mlの希塩酸溶液を、200mlの水に変更した他は、実施例1と全く同様にした。

(実施例4) 実施例1と同じ原料茶葉10gを共栓付三角フラスコ(300ml容量)に入れ、100mlの水を加えて、10分間振とうした。その後、容器を転倒させ、水を除いた。次に、前記容器内の茶葉に100mlの水を加え5分間振とう後、容器を転倒させ、液を除去した。これを5回繰り返した。さらに、前記容器内の茶葉に0.08重量%(茶葉に対して0.12重量%)のアスコルビン酸ナトリウムを含む150mlの80℃熱水を加えて1時間抽出した。抽出終了後、ただちにヌッチェを用いて、減圧濾過した。濾過後の吸引瓶中の抽出液をナス型フラスコに移し、エバポレーターで濃縮した。これをさらに、真空乾燥器で約20時間乾燥した。

(実施例5) 実施例1と同じ原料茶葉10gを共栓付三角フラスコ(300ml容量)に入れ、100mlの水を加えて、10分間振とうした。その後、容器を転倒させ、水を除いた。次に、前記容器内の茶葉に100mlの水を加え5分間振とう後、容器を転倒させ、液を除去した。これを5回繰り返した。さらに、前記容器内の茶葉に150mlの80℃熱水を加えて1時間抽出した。抽出終了後、ただちにヌッチェを用いて、減圧濾過し

た。濾過後の吸引瓶中の抽出液をナス型フラスコに移し、エバポレーターで濃縮した。これをさらに、真空乾燥器で約20時間乾燥した。

(比較例1) 実施例1と同じ原料茶葉10gを共栓付三角フラスコ(300ml容量)に入れ、40%エタノール水溶液を300ml加え室温で1時間抽出した。抽出終了後、直ちにヌッチェを用いて、減圧濾過した。濾過後の吸引瓶中の抽出液をナス型フラスコに移し、エバポレーターで濃縮した。これをさらに、真空乾燥器で約20時間乾燥した。

(比較例2) 実施例1と同じ原料茶葉10gを共栓付三角フラスコ(300ml容量)に入れ、80℃の熱水を300ml加え1時間抽出した。抽出終了後、直ちにヌッチェを用いて、減圧濾過した。濾過後の吸引瓶中の抽出液をナス型フラスコに移し、エバポレーターで濃縮した。これをさらに、真空乾燥器で約20時間乾燥した。

【0036】以上の実施例1～5および比較例1、2で得られた抽出物について、以下に示す方法により、5'リボヌクレオチダーゼ阻害活性、ポリフェノール含有量を測定するとともに、色差計により色調の測定を行った。結果を表1に示す。

【0037】

【表1】

	色調			ポリフェノール (%)	阻害活性 (%)
	L 値	a 値	b 値		
実施例 1	91	-1	38	85	70
実施例 2	92	0	30	86	71
実施例 3	77	4	66	83	62
実施例 4	80	-1	42	65	42
実施例 5	73	4	61	64	40
比較例 1	80	0	60	55	13
比較例 2	82	-2	57	52	5

【0038】(5'リボヌクレオチダーゼ阻害活性の測定) 阻害活性は、キャベツホモジネート上清を用いて求めた。すなわち、キャベツ100gに水50gを加えてホモジナイズし、このホモジネートを5'リボヌクレオチダーゼの酵素源として使用した。阻害活性測定は、5'リボヌクレオチドの1種であるイノシン酸二ナトリウムの残存量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で定量することにより算出した。即ち、検体10mgにエタノール60μlを添加して懸濁させ、前記キャベツホモジネート1.5gを加え、これに35mMイノシン酸二ナトリウム水溶液440μlを加え、37℃で4時間反応させた。反応を25%トリクロロ酢酸0.6ml添加により停止し、反応液を遠心分離した。この上清のイノシン酸量を測定した。そして、阻害活性の算出方法は、下記により阻害率(%)として求めた。

<阻害活性を算出する式>

$$\text{阻害率}(\%) = 100 - (X - A) / (B - A) \times 100$$

A: 被検サンプル無添加時の0時間反応後のイノシン酸

量(μmol)

B: 被検サンプル無添加時の4時間反応後のイノシン酸量(μmol)

X: 被検サンプル添加時の4時間反応後のイノシン酸量(μmol)

なお、HPLCの条件は以下のとおりであった。

【0039】カラム: COSMOSIL 5C18

移動層: 0.03M リン酸カリウム: アセトニトリル = 98:2

(ポリフェノール含有量の測定) ポリフェノールの含有量の測定は、HPLCで検出されたエピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガラート、エピガロカテキンガラートの面積値の全ピーク面積に対する割合を計算することで算出した。

【0040】なお、HPLCの条件は次の通りであった。

カラム: COSMOSIL 5C18

移動層: A液 水: アセトニトリル = 95:5 (85% リン酸液0.05%含む)

B液 水：アセトニトリル＝5：95（85%リン酸液0.05%含む）

最初A液：B液＝95：5で展開し、最後はB液100%となるようにグラジュエント方式で展開

実施例1および比較例1の抽出物のHPLCチャートを図1に示した。

【0041】実施例1～5と比較例1、2との比較から、茶葉を熱湯やエタノール水溶液で抽出しただけではほとんど効果のない茶葉が、予備抽出を行うことで、阻害率が40～70%の阻害活性を持つことが分かった。さらにポリフェノールの相対面積値は、52～55%のものが64～85%となった。また、色調についても予備抽出に水を用いると、色調が、比較例よりも低下するのに対して、塩酸を含む水で予備抽出を行った場合（実施例1）には色調が良くなり、また、水で予備抽出したものは、抽出時の溶媒にアスコルビン酸ナトリウムを添加すると（実施例4）色調低下が抑制されているのが分かる。しかし、アスコルビン酸ナトリウムを添加した場合、阻害活性は、アスコルビン酸ナトリウムが含まれるために、単位重量当たりのポリフェノール量が若干減り、アスコルビン酸ナトリウム無添加の場合と殆ど変わらなかった。

【0042】また、図1から明らかなように、塩酸を含む水で予備抽出を行った後、抽出して得られる本発明の抽出物の場合、予備抽出を行わない比較例の抽出物に比べてカフェイン含有量が少ないとともに、エピガロカテキンガレート、エピカテキンガラートの含有量が多いことが分かる。

（実施例6）食塩68重量%、グルタミン酸ソーダ23重量%、イノシン酸ソーダ7重量%、および前記実施例1の抽出物2重量%を含有する調味料67gを水500mlに加えて調味液とし、この調味液に塩漬けておいた白菜1Kgを漬物作製の常法に従って漬け、冷暗所に4日間保蔵した漬物と、前記抽出物が除かれた以外は前記漬物と全く同様に作製された漬物とを、13人のパネラーに試食（盲目テスト）してもらったところ、パネラー全員が、前記抽出物を含む調味液により作製された漬物の方が、イノシン酸によるおいしさ、塩辛さを抑えたまろやかな味等によるおいしさを感じ、前記抽出物を添加していない漬物は塩辛く生に近い味と感じた。また、それぞれの白菜中に含まれるイノシン酸量をHPLCで定量することにより算出した。即ち、前記白菜の漬物約5gを正確に量りとり、これに市水122mlを加えてホモジナイズ後、その液4.2mlに25%トリクロロ酢酸液0.1mlを加えた後、遠心分離を行い、その上清を濾過し水で10倍に希釈したものをHPLCで測定した。その結果、前記抽出物を添加した場合の白菜の漬物中のイノシン酸量は506 μ g/gであり、無添加の場合は14 μ g/gであった。

（実施例7）実施例6において、調味液に添加した抽出

物を前記実施例2の抽出物に置き換えた以外は全く同様の処方により試験を行ったところ、13人のパネラー全員が、前記抽出物を添加した白菜の漬物の方が、無添加のものに比べておいしく感じた。また、前記抽出物を添加した白菜の漬物中のイノシン酸量は480 μ g/gであり、無添加の場合は15 μ g/gであった。

（実施例8）実施例6において、調味液に添加した抽出物を前記実施例3の抽出物に置き換えた以外は全く同様の処方により試験を行ったところ、13人のパネラー全員が、前記抽出物を添加した白菜の漬物の方が、無添加のものに比べておいしく感じた。また、前記抽出物を添加した白菜の漬物中のイノシン酸量は412 μ g/gであり、無添加の場合は14 μ g/gであった。

（実施例9）食塩6g、グルタミン酸ソーダ20g、イノシン酸ソーダ7g、淡口醤油700g、前記実施例1の抽出物2.4g、ソルビン酸1.6g、および微量の色素を水600mlに加えて調味液とし、この調味液に塩蔵胡瓜1Kgを圧搾したものを漬物作製の常法に従って漬け、冷暗所に2日間保蔵した後、袋詰めし、80℃で20分加熱殺菌後、室温で2ヶ月保蔵した漬物と、前記抽出物が除かれた以外は前記漬物と全く同様に作製された漬物とを、13人のパネラーに試食（盲目テスト）してもらったところ、パネラー全員が、前記抽出物を含む調味液により作製された漬物の方が、イノシン酸によるおいしさ、塩辛さを抑えたまろやかさ等よりおいしく感じ、抽出物を添加していない漬物は塩辛く生に近い味と感じた。また、それぞれの胡瓜の漬物中に含まれるイノシン酸量をHPLCで定量することにより算出した。即ち、胡瓜の漬物約5gを正確に量りとり、これに市水122mlを加えてホモジナイズ後、その液4.2mlに25%トリクロロ酢酸液0.1ml加えた後、遠心分離を行い、その上清を濾過し水で10倍に希釈したものをHPLCで測定した。その結果、抽出物を添加した胡瓜の漬物中のイノシン酸量は431 μ g/gであり、無添加の場合は20 μ g/gであった。

（実施例10）食塩6g、グルタミン酸ソーダ20g、イノシン酸ソーダ7g、淡口醤油700g、前記実施例2の抽出物2.4g、ソルビン酸1.6g、および微量の色素を水600mlに加えて調味液とし、この調味液に塩蔵胡瓜1Kgを圧搾したものを漬物作製の常法に従って漬け、冷暗所に2日間保蔵した後、袋詰めし、80℃で20分加熱殺菌後、室温で2ヶ月保蔵した漬物と、前記抽出物が除かれた以外は前記漬物と全く同様に作製された漬物とを、13人のパネラーに試食（盲目テスト）してもらったところ、パネラー全員が、前記抽出物を含む調味液により作製された漬物の方が、イノシン酸によるおいしさ、塩辛さを抑えたまろやかさ等よりおいしく感じ、抽出物を添加していない漬物は塩辛く生に近い味と感じた。また、それぞれの胡瓜の漬物中に含まれるイノシン酸量を実施例9と同様に算出した。そ

の結果、前記抽出物を添加した胡瓜の漬物中のイノシン酸量は $416\mu\text{g/g}$ であり、無添加の場合は $29\mu\text{g/g}$ であった。

(実施例11) 食塩6g、グルタミン酸ソーダ20g、イノシン酸ソーダ7g、淡口醤油700g、前記実施例3の抽出物2.4g、ソルビン酸1.6g、および微量の色素を水600mlに加え、この調味液に塩蔵胡瓜1Kgを圧搾したものを漬物作製の常法に従って漬け、冷暗所に2日間保蔵した後、袋詰めし、 80°C で20分加熱殺菌後、室温で2ヶ月保蔵した漬物と、前記抽出物が除かれた以外は前記漬物と全く同様にして作製された漬物とを、13人のパネラーに試食(盲目テスト)してもらったところ、パネラー全員が、前記抽出物を含む調味液により作製された漬物の方が、イノシン酸によるおいしさ、塩辛さを抑えたまろやかさ等よりおいしく感じ、抽出物を添加していない漬物は塩辛く生に近い味と感じた。また、それぞれの胡瓜の漬物中に含まれるイノシン酸量を実施例9と同様に算出した。その結果、前記抽出物を添加した胡瓜の漬物中のイノシン酸量は $317\mu\text{g/g}$ であり、無添加の場合は $20\mu\text{g/g}$ であつた。

(実施例12) グチ172gをすりつぶしてすり身としたものにデンプン13g、大豆蛋白3g、食塩3g、砂糖5g、グルタミン酸ソーダ1.5g、イノシン酸ソーダ200mg、および前記実施例1の抽出物0.2gを加え、冷やしながらかよくすりつぶし混ぜ込み、形を整え、 25°C で12時間放置した後、蒸し器に入れ、 85°C で50分蒸し、冷却して得た蒲鉾と、前記抽出物が除かれた以外は前記蒲鉾と全く同様にして作製された蒲鉾とを、13人のパネラーに試食(盲目テスト)してもらったところ、全員が前記抽出物を含む蒲鉾の方を無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例13) 実施例12において、用いた抽出物を前記実施例2の抽出物に置き換えた以外は全く同様の処方により試験を行ったところ、13人のパネラー全員が前記実施例2の抽出物を添加した方を無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例14) 実施例12において、用いた抽出物を前記実施例3の抽出物に置き換えた以外は全く同様の処方により試験を行ったところ、13人のパネラー全員が前記実施例3の抽出物を添加した方を無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例15) 食塩80g、リンゴ酸ソーダ20g、グルタミン酸ソーダ8g、アスコルビン酸ソーダ1.9g、イノシン酸ソーダ4g、前記実施例1の抽出物2g、および少量の赤唐辛子に水80mlを加えて調製した液に、たらこ卵1Kgを漬け、1時間ごとに手返しを行い、10時間漬け込んで得た辛子明太子と、前記抽出物が除かれた以外は前記辛子明太子と全く同様にして作製された辛子明太子とを、室温で1週間放置後、13人

のパネラーに試食(盲目テスト)してもらったところ、パネラー全員が、前記抽出物を含む辛子明太子の方が、イノシン酸ソーダによるおいしさと、塩辛さが減少したまろやかさ等により無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例16) 実施例15において、用いた前記実施例1の抽出物を前記実施例2の抽出物に置き換えて同様の処方により試験を行ったところ、13人のパネラー全員が、前記実施例1の抽出物を添加した時と同様に、前記実施例2の抽出物を添加した辛子明太子の方が無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例17) 実施例15において、用いた前記実施例1の抽出物を前記実施例3の抽出物に置き換えて同様の処方により試験を行ったところ、13人のパネラー全員が、前記実施例1の抽出物を添加した時と同様に、前記実施例3の抽出物を添加した辛子明太子の方が無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例18) 市販の味噌100gに、イノシン酸ソーダ400mg、および前記実施例1の抽出物0.3gを水3mlに溶解、分散したものを添加、混合した後、袋詰めしたものと、前記抽出物が除かれた以外は上記味噌と全く同様にして作製された味噌とを、約1週間放置後、13人のパネラーに試食してもらったところ、パネラー全員が、前記抽出物を含む味噌の方が、イノシン酸によるおいしさと塩辛さが減少したまろやかさ等により無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例19) 実施例18において、用いた抽出物を前記実施例2の抽出物に置き換えた以外は全く同様の処方により試験を行ったところ、13人のパネラー全員が、前記実施例1の抽出物の時と同様に、前記実施例2の抽出物を添加した味噌の方を無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例20) 実施例18において、用いた抽出物を前記実施例3の抽出物に置き換えた以外は全く同様の処方により試験を行ったところ、13人のパネラー全員が、前記実施例1の抽出物の時と同様に、前記実施例3の抽出物を添加した味噌の方を無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例21) 食塩2g、リン酸ソーダ1.5g、グルタミン酸ソーダ0.5g、イノシン酸ソーダ0.5g、前記実施例1の抽出物0.2g、砂糖、亜硝酸ソーダ、およびスパイス少々をそれぞれに水を加えて50mlとしたものを、200gの豚ロース肉に注射器により注入し、 5°C で3昼夜マッサージタンブリング後、 80°C で60分表面乾燥させ、塩化ビニリデンフィルムでパックした後、 80°C で60分煮沸殺菌し冷却して得たハムと、前記抽出物が除かれた以外は前記ハムと全く同様にして作製されたハムとを、 4°C で2週間放置後、13人のパネラーに試食(盲目テスト)してもらったところ、パネラー全員が、前記抽出物を含むハムの方が、イノシ

ン酸ソーダによるおいしさと塩辛さが減少したまろやかさ等により無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例22) 実施例21において、用いた抽出物を前記実施例2の抽出物に置き換えた以外は全く同様の処方により試験を行ったところ、13人のパネラー全員が、前記実施例1の抽出物の時と同様に、前記実施例2の抽出物を添加したハムの方を無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例23) 実施例21において、用いた抽出物を前記実施例3の抽出物に置き換えた以外は全く同様の処方により試験を行ったところ、13人のパネラー全員が、前記実施例1の抽出物の時と同様に、前記実施例3の抽出物を添加したハムの方を無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例24) 食塩1.3g、リン酸ソーダ0.6g、砂糖0.4g、グルタミン酸ソーダ0.2g、イノシン酸ソーダ0.1g、前記実施例1の抽出物0.1g、および亜硝酸ソーダ0.03gに水を加えて25mlとした液と、豚肉赤身をミンチ肉としたもの100gとをホモジナイズしたものを塩化ビニリデンフィルムでパックした後、5℃で5日間熟成させ、80℃で60分間煮沸して得たソーセージと、前記抽出物が除かれた以外は前記と全く同様にして作製されたソーセージとを、4℃で2週間放置後、15人のパネラーに試食(盲目テスト)してもらったところ、パネラー全員が、前記抽出物を添加したソーセージの方が抽出物によるおいしさと塩辛さが減少したまろやかさ等により、無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例25) 実施例24において、用いた抽出物を前記実施例2の抽出物に置き換えた以外は全く同様の処方により試験を行ったところ15人のパネラー全員が、前記実施例1の抽出物の時と同様に、前記実施例2の抽出物を添加したソーセージの方を、無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例26) 実施例24において、用いた抽出物を前記実施例3の抽出物に置き換えた以外は全く同様の処方により試験を行ったところ15人のパネラー全員が、前記実施例1の抽出物の時と同様に、前記実施例3の抽出物を添加したソーセージの方を、無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例27) 豚ミンチ肉80g、玉葱18g、パン粉6g、大豆蛋白15g、水28g、食塩0.6g、卵白パウダー1g、グルタミン酸ソーダ0.2g、イノシン酸ソーダ0.1g、および前記実施例1の抽出物0.1gをミキサーでよくブレンドしたものを室温で3時間放置後、フライパン上でナタネ油により焼いて得たハンバーグと、前記実施例1の抽出物が除かれた以外は前記ハンバーグと全く同様にして作製されたハンバーグとを、15人のパネラーに試食(盲目テスト)してもらったところ、パネラー全員が、前記抽出物を含むハンバーグの

方が、イノシン酸ソーダによるおいしさと塩辛さが減少したまろやかさ等により、無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例28) 実施例27において、用いた抽出物を前記実施例2の抽出物に置き換えて同様の処方により試験を行ったところ、15人のパネラー全員が、前記実施例1の抽出物の時と同様に、前記実施例2の抽出物を添加したハンバーグの方を、無添加の場合に比べておいしく感じた。

10 (実施例29) 実施例27において、用いた抽出物を前記実施例3の抽出物に置き換えて同様の処方により試験を行ったところ、15人のパネラー全員が、前記実施例1の抽出物の時と同様に、前記実施例3の抽出物を添加したハンバーグの方を、無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例30) 小麦粉25g、食塩0.3g、砂糖1.2g、イースト0.7g、ショートニング0.7g、水11gを皮とし、これに豚ミンチ7g、大豆蛋白1g、水1.7g、玉葱5.5g、白葱1g、ガーリック0.1g、醤油1.4g、みりん1g、砂糖0.4g、食塩0.2g、ゴマ油0.3g、澱粉0.2g、グルタミン酸ソーダ0.05g、イノシン酸ソーダ0.05g、および前記実施例1の抽出物0.02gをよく混ぜ合わせたものを具とし、室温で1時間放置後、温度40℃、湿度20%で40分間発酵させ、20分間蒸し器で蒸して得た肉まん、と、前記抽出物が除かれた以外は、前記肉まん、と全く同様にして作製された肉まん、とを、15人のパネラーに試食(盲目テスト)してもらったところ、パネラー全員が、前記抽出物を含む肉まんの方が、イノシン酸ソーダによるおいしさと塩辛さが減少したまろやかさ等により、無添加の場合に比べておいしく感じた。

30 (実施例31) 実施例30において、用いた抽出物を前記実施例2の抽出物に置き換えた以外は全く同様の処方により試験を行ったところ、15人のパネラー全員が、前記実施例1の抽出物の時と同様に、前記実施例2の抽出物を添加した肉まんの方が、無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例32) 実施例30において、用いた抽出物を前記実施例3の抽出物に置き換えた以外は全く同様の処方により試験を行ったところ、15人のパネラー全員が、前記実施例1の抽出物の時と同様に、前記実施例3の抽出物を添加した肉まんの方が、無添加の場合に比べておいしく感じた。

(実施例33) 実施例1と同様の予備抽出、及び抽出後、減圧濾過時に濾紙の上に15gのケイ酸マグネシウム(商品名ミズカライフF1;水澤化学工業株式会社製)を敷き詰め、これに300mlの抽出液を流し込み濾過した後、濃縮、乾燥した。

50 (実施例34) 比較例1と同様の抽出後、減圧濾過時に、濾紙の上に15gのケイ酸マグネシウム(商品名ミ

ズカライフF1；水澤化学工業株式会社製）を敷き詰め、これに300mlの抽出液を流し込み濾過した後、濃縮、乾燥した。

（実施例35）比較例1と同様の抽出後、減圧濾過時に、抽出液に15gのケイ酸マグネシウム（商品名ミズカライフF1；水澤化学工業株式会社製）を加え、1時間振とう後、減圧濾過、濃縮、乾燥した。

（実施例36）比較例2と同様の抽出後、減圧濾過時に、濾紙の上に15gのケイ酸マグネシウム（商品名ミズカライフF1；水澤化学工業株式会社製）を敷き詰め、これに300mlの抽出液を流し込み濾過した後、濃縮、乾燥した。

（実施例37）比較例1と同様の抽出後、減圧濾過時に、濾紙の上に15gの活性白土（ナカライテスク株式会社製）を敷き詰め、これに300mlの抽出液を流し込み濾過した後、濃縮、乾燥した。

【0043】以上の実施例33～37で得られた抽出物について、先に示した方法により、5' リボヌクレオチダーゼ阻害活性、ポリフェノール含有量を測定するとともに、色差計により色調を測定した。結果を表2に示す。

10 【0044】

【表2】

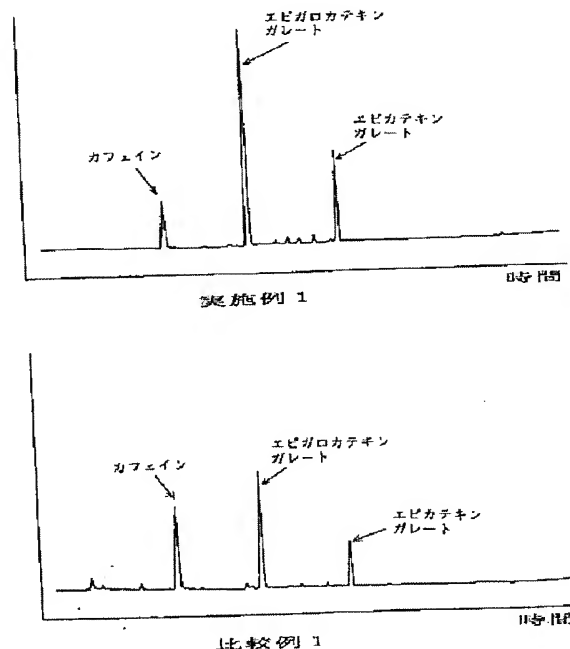
	色調			ポリフェノール (%)	阻害活性 (%)
	L 値	a 値	b 値		
実施例33	90	0	40	93	86
実施例34	83	-1	61	66	42
実施例35	79	0	60	61	32
実施例36	82	-2	58	61	30
実施例37	70	3	60	71	53

【0045】表1と表2の比較から明らかなように、抽出後にケイ酸塩で処理することで、抽出物中のポリフェノールの含有量が増大するとともに、5' リボヌクレオチダーゼ阻害活性も向上することが分かる。

【図面の簡単な説明】

20 【図1】 実施例1および比較例1の抽出物のHPLCチャートである。

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

F I

A 2 3 L 1/221

A 2 3 L 1/31

A

1/31

1/317

A

1/317

Z

1/325

1 0 1 F

1/325

1 0 1

1/328

Z

1/328

1/48

1/48

A 2 3 B 4/00

H